

07.1.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 2 月    9 日  
Date of Application:

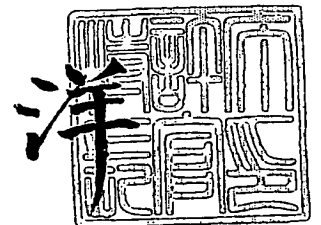
出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 4 1 0 4 1 5  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 4 1 0 4 1 5 ]

出      願      人            株式会社資生堂  
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 2 月 2 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 1 1 6 5 6 9

【書類名】 特許願  
【整理番号】 1034443  
【提出日】 平成15年12月 9日  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿  
【国際特許分類】 G01N 33/50  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
    【氏名】 藤田 宏志  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県相模原市古淵 5-16-3  
    【氏名】 久保 早苗  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
    【氏名】 安田 正明  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
    【氏名】 平尾 哲二  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000001959  
    【氏名又は名称】 株式会社資生堂  
【代理人】  
    【識別番号】 100099759  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 青木 篤  
    【電話番号】 03-5470-1900  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100077517  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 石田 敬  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100087413  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 古賀 哲次  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100117019  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 渡辺 陽一  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100082898  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 西山 雅也  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 209382  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0305959

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

毛髪のダメージを評価する方法であって、毛髪における酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法。

**【請求項 2】**

前記ダメージが毛髪のパーマ処理、ブリーチ処理、酸化染毛剤処理、コーミング、熱処理、紫外線に対する暴露、プールでの次亜塩素酸に対する暴露のいずれか又はそれらの複数の組合せに起因する、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する、請求項 1 又は 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

前記ヒドラジノ基含有蛍光物質がフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びダンシルヒドラジンから成る群から選ばれる、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 5】**

前記評価が蛍光顕微鏡下で行われる、請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 6】**

前記ヒドラジノ基含有蛍光物質がダンシルヒドラジンであり、前記蛍光の検出が目視で行われる、請求項 3 記載の方法。

**【請求項 7】**

毛髪のダメージを評価する方法に利用するためのキットであって、酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識するための蛍光物質を含んで成ることを特徴とするキット。

**【請求項 8】**

前記蛍光物質がヒドラジノ基含有蛍光物質である、請求項 7 記載のキット。

**【請求項 9】**

前記ヒドラジノ基含有蛍光物質がフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びダンシルヒドラジンから成る群から選ばれる、請求項 7 又は 8 記載のキット。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】毛髪中の酸化タンパク質を指標とする毛髪ダメージ評価方法

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、毛髪における酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで毛髪のダメージ度の評価を行う方法、及びその方法を実施するために利用されるキットを提供する。

## 【背景技術】

【0002】

毛髪はパーマ処理、ブリーチや酸化染毛剤処理、コーミング、ドライヤー等による熱処理、紫外線に対する暴露、プールでの次亜塩素酸に対する暴露など、様々な外的要因によってダメージを受ける。毛髪は一度ダメージを受けると修復することはない。加えて、ダメージが経時的に進行してしまう場合もある。従って、毛髪の健康状態を保つには日頃のケアによりダメージを与えにくくすることも当然ながら、そのダメージ度を認識しておき、ダメージの進行を抑制することも極めて重要である。毛髪のダメージ度を評価する方法として、視感評価、物性評価などの方法が知られており、例えば走査型電子顕微鏡による毛髪の表面分析法 (Swift J.A. ら、J. Society of Cosmetic Chemists (1972) Vol.23, p.695)、毛髪の機械的強度を測定する引張試験法 (Donald E.D. ら、J. Society of Cosmetic Chemists (1968) Vol.19, p.395)、毛髪の内部構造変化を測定する方法 (Humphres W. T. ら、J. Society of Cosmetic Chemists (1972) Vol.23, p.359)、毛髪を蛍光物質で標識し、蛍光顕微鏡でダメージを測定する方法 (Tate M.L. ら、J. Society of Cosmetic Chemists (1993) Vol.44, p.347) などがあるが、いずれも特別な装置を要したり、操作がめんどろであるといった欠点を有する。

【0003】

特開平8-178920号公報や特開平8-271515号公報は、例えばパーマ処理などによるケラチンに多数含まれる S-S 結合の切断の結果生ずる SH 基を毛髪ダメージの指標とし、当該 SH 基を選択的に標識する蛍光物質、例えば N-(9-アクリジニル) マレイミドや N-(7-ジメチル-アミノ-4-メチルクマリニル) マレイミドで毛髪を蛍光染色して、毛髪のダメージ度を測定する方法を開示する。これらの方法によれば、ダメージの検出は蛍光顕微鏡などを要せずにして目視で行われ、測定の簡便化が図れる。一般に、パーマ処理は還元処理により毛髪ケラチン内の S-S 結合を一旦切断して SH 基を生じせしめ、後に酸化処理によりその SH 基を S-S 結合に戻すといった工程から成る。また、ブリーチ処理は酸化処理だけからなる。しかし、パーマ処理、ブリーチ処理ともに酸化反応が過度に進行すると、SH 基や S-S 結合がシステイン酸 (SO<sub>3</sub>H) に変化し、これが毛髪ダメージの一因であることが知られている。システイン酸は、SH 基を選択的に標識する蛍光物質とは反応しないので、SH 基を毛髪ダメージの指標とするこれらの方法により得られる結果は、毛髪の実際のダメージ度を的確に反映していない場合があると考えられる。

【特許文献1】特開平8-178920号公報

【特許文献2】特開平8-271515号公報

【特許文献3】特開平9-127105号公報

【非特許文献1】J. Society of Cosmetic Chemists (1993) Vol.44, p.347

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、簡便で、しかも毛髪の実際のダメージをより正確に反映した、毛髪ダメージ度を評価する方法の提供を課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、毛髪のダメージ度を評価する方法を提供する。この方法は、毛髪における酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行う

ことを特徴とする。かかるダメージは毛髪のパーマ処理、ブリーチや酸化染毛剤処理、コーミング、ヘアドライヤー等の熱処理、紫外線に対する暴露、プールでの次亜塩素酸に対する暴露のいずれか又はそれらの複数の組合せに起因し得る。

#### 【0006】

好適な態様において、酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する。好ましくは、かかるヒドラジノ基含有蛍光物質はフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びダンシルヒドラジンから成る群から選ばれる。

好適な態様において、上記評価は蛍光顕微鏡下で行われ得る。しかしながら、ヒドラジノ基含有蛍光物質がダンシルヒドラジンの場合、前記蛍光の検出は目視で行うことができる。

#### 【0007】

別の観点において、本発明は毛髪のダメージを評価する方法に利用するためのキットを提供する。このキットは、酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識するための蛍光物質を含んで成ることを特徴とする。

#### 【0008】

好ましくは、蛍光物質はヒドラジノ基含有蛍光物質であり、より好ましくはヒドラジノ基含有蛍光物質はフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びダンシルヒドラジンから成る群から選ばれる。

#### 【発明の効果】

#### 【0009】

本発明により、簡便で、しかも毛髪の実際のダメージを的確に反映する結果を示す、毛髪ダメージ評価方法が提供される。この評価方法により、パーマ処理、ブリーチや酸化染毛剤処理、コーミング、ヘアドライヤー等による熱処理、紫外線暴露、プールの次亜塩素酸薬剤に対する暴露などに起因するダメージが評価できる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0010】

本発明は、毛髪における酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで毛髪のダメージ度の評価を行う方法、及びその方法を実施するために利用されるキットを提供する。

#### 【0011】

毛髪(又は毛幹)はその表面を覆う毛小皮、その内部にあって毛髪の大部分を占める毛皮質及び中心部の毛髄質から構成される。特に毛小皮は毛髪の根元から先端に向かって鱗状に重なって毛髪の表面を覆い、内部を保護し、毛小皮に損傷がなく、健全な状態であれば、毛髪は艶やかに見える。毛髪はタンパク質80~90%、脂質1~8%、微量元素0.6~1.0%、そして水12~13%から概ね構成される。毛髪中のタンパク質には様々なものが存在するが、主だったタンパク質はケラチンである。ケラチンを含む毛髪タンパク質はパーマ剤、ブリーチ剤、酸化染毛剤等に含まれる化学系酸化剤、紫外光、大気汚染物質、プールに使われる次亜塩素系薬剤、コーミングによる摩擦、ヘアドライヤー等による熱などの様々な因子に対する暴露に伴い、酸化を受けた結果カルボニル基が導入される。このような酸化には、タンパク質におけるLys、Arg、Proといったアミノ酸残基のNH<sub>2</sub>基が直接酸化されてカルボニル基となる場合と、脂質が酸化して過酸化脂質、更には分解して反応性の高いアルデヒドとなり、それがタンパク質と結合することで起こる場合とが考えられる。

#### 【0012】

本発明において利用できる酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識する蛍光物質は、酸化タンパク質のカルボニル基に結合できるヒドラジノ基



を有するものが好ましい。そのような蛍光物質の例には、フルオレセイン-5-チオセミカルバジド、ダンシルヒドラジン、テキサスレッドヒドラジド、ルシファーイエローヒドラシド等が挙げられる。

**【0013】**

このようなヒドラジノ基含有蛍光物質を使用する場合、酸化タンパク質の検出は例えば以下のようにして実施できる：

- (1) 毛髪を採取する；
- (2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のヒドラジノ基含有蛍光物質を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3) 反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、酸化タンパク質を例えば蛍光顕微鏡で検出する；
- (4) 任意的に、顕微鏡写真撮影する。

**【0014】**

紫外線を照射することにより目視できる蛍光を発光する蛍光物質、例えばダンシルヒドラジンをヒドラジノ基含有蛍光物質として使用する場合、蛍光標識された酸化タンパク質は蛍光顕微鏡を使うことなく、目視だけで検出することもできる。紫外線を照射することにより目視できる蛍光を発光するその他の蛍光物質としては、N-（9-フルオレニルメトキシカルボニル）ヒドラジン（FMOC-ヒドラジン）等が挙げられる。

**【0015】**

紫外線を照射することにより目視できる蛍光を発光する蛍光物質、例えばダンシルヒドラジンをヒドラジノ基含有蛍光物質を使用する場合、酸化タンパク質の検出は例えば以下のようにして実施できる：

- (1) 毛髪を採取する；
- (2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のヒドラジノ基含有蛍光物質を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3) 反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、これに例えばブラックライトなどを使用して紫外線を照射する；
- (4) 蛍光を発する酸化タンパク質を目視観察する；
- (5) 任意的に、写真撮影する。

**【0016】**

酸化タンパク質の特異的な蛍光標識は、ビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの組合せを用いることもできる。ビオチンヒドラジドもヒドラジノ基を有するため、タンパク質のカルボニル基に結合できる。この場合、まず酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを結合させ、しかる後に蛍光標識アビジンをビオチン-アビジン結合を介してビオチンヒドラジドに結合させ、その結果酸化タンパク質は蛍光標識される。ビオチンヒドラジドは当業界においてよく知られ、例えばピアース社から製造販売されているものを使用することができる。また、蛍光アビジンは、例えばフルオレセインアビジンなどが使用できる。

**【0017】**

このようなヒドラジノ基含有蛍光物質を使用する場合、酸化タンパク質の検出は例えば以下のようにして実施できる：

- (1) 毛髪を採取する；
- (2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のビオチンヒドラジドを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3) 反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、蛍光標識アビジンを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (4) 酸化タンパク質を例えば蛍光顕微鏡で検出する；
- (5) 任意的に、顕微鏡写真撮影する。

**【0018】**

本発明に係るキットは、上述の蛍光物質の他に、上述の各種評価方法の実施に必要な試薬、例えば各種緩衝剤も一緒に含んでよい。

**【0019】**

本発明者は、以降の実施例においても示すように、毛髪内の酸化タンパク質の量は毛髪のダメージ度にある程度相関することを見出した。例えば、パーマ処理に使用される酸化

剤は一般に過酸化水素系のものと臭素酸ナトリウム系の2種類に分類され、その中で過酸化水素系の方が酸化力が強く、毛髪に及ぼすダメージが大きいことがよく知られている。そして、酸化タンパク質を指標とし、過酸化水素系及び臭素酸ナトリウム系パーマ処理による毛髪のダメージ度を比較したところ、過酸化水素系パーマ処理した毛髪の方が臭素酸ナトリウム系パーマ処理毛髪と比べ強いダメージを受けていることを見出した。また、毛髪のブリーチ処理は、パーマ処理とは異なり毛髪を酸化処理するだけの工程から成るものであり、反応が過度に進行するとSH基やS-S結合がシステイン酸(SO<sub>3</sub>H)に変化するため、従来のSH基を指標とした方法では、ダメージを正確に評価することができなかった。しかし、酸化タンパク質を指標とし、ブリーチ処理及びパーマ処理による毛髪のダメージ度を比較したところ、ブリーチ処理した毛髪の方がパーマ処理毛髪と比べ比較的強いダメージを受けることを見出した。これらの結果から、毛髪のダメージ度の上昇に伴い、毛髪中の酸化タンパク質の量も増大することが明らかとなった。よって、酸化タンパク質を指標とする毛髪ダメージ評価方法は、毛髪の実際のダメージをよりの確に反映した結果を示すことがわかる。

#### 【0020】

上記の酸化タンパク質の検出方法及びキットを使用することで、酸化タンパク質を指標とした簡便な毛髪のダメージ測定が可能となる。本発明の方法はタンパク質の抽出操作、電気泳動操作、ウェスタンブロッティング操作などを必要とせず、蛍光顕微鏡さえあれば実施可能となる。また、蛍光物質としてダンシルヒドラジンなどを使用すれば、紫外線を照射するだけで蛍光染色された酸化タンパク質を目視評価することも可能である。従って、上記の酸化タンパク質の検出方法及びキットは、毛質の評価にとって有力な情報を簡単な操作及び設備で実施できるものとし、例えば化粧品販売の店頭等でも簡単に実施することが可能である。

#### 【0021】

本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明する。

#### 【実施例1】

#### 【0022】

フルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる毛髪酸化タンパク質の検出

9人の被験者(毛髪化学的処理経験なし)の毛髪の根元側と先端側(根元から約20センチの箇所)を5センチの長さで1本ずつ採取し、下記の組成を有する洗浄剤(処方1)に室温で10分間浸して洗浄し、その後1時間水に浸してすすぎを行った。それを乾燥させた後に、アロンアルファでスライドガラスに固定した。それを20 $\mu$ Mのフルオレセイン-5-チオセミカルバジドの100mMのMES-Na緩衝液(pH5.5)に1時間、室温で反応させた。反応終了後はPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察し、画像を1サンプルにつき4枚ずつ取り込んだ。数値化に際しては、画像から毛髪と背景を分離し、毛髪の平均輝度を求めた。

#### 【0023】

#### 処方1(洗浄剤)

原料名	配合量(質量%)
アルスコープNM((株)東邦化学)	6.80
ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン液(30%)	1.20
クエン酸	0.06
安息香酸ナトリウム	0.09
EDTA・3Na	0.01
イオン交換水	91.84
合計	100.00

#### 【0024】

図1にその結果を示す。図1から明らかなとおり、根元側では個人差が観察されなかった。それに対して、先端側ではかなりの個人差が観察された。髪の手入れの仕方の個人差等を反映しているものと考えられる。

#### 【実施例2】



## 【0025】

フルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる毛髪酸化タンパク質の検出

一人の被験者（毛髪化学的処理経験なし）の毛髪の先端側を5センチの長さで3本採取し、洗浄剤（処方1）に室温で10分間浸して洗浄し、その後1時間水に浸してすすぎを行った。1本目に対しては、紫外線(UVA)を200J/cm<sup>2</sup>照射し、2本目に対しては0.2mM次亜塩素酸ナトリウム中に37℃で16時間インキュベートし、最後の3本目に対しては何の処理も行わなかった。紫外線処理、次亜塩素酸ナトリウム処理を行った毛髪は、最後に、洗浄剤（処方1）に室温で10分間浸して洗浄し、その後1時間水に浸してすすぎを行った。それらを乾燥させた後に、アロンアルファでスライドガラスに固定した。それを20μMのフルオレセイン-5-チオセミカルバジドの100mMのMES-Na緩衝液(pH5.5)に室温で1時間反応させた。反応終了後はPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察し、画像を1サンプルにつき12枚ずつ取り込んだ。数値化に際しては、画像から毛髪と背景を分離し、毛髪の平均輝度を求めた。

## 【0026】

図2は上記のとおり蛍光処理した毛髪の蛍光顕微鏡写真図であり、図3は各毛髪の平均輝度を示す。図2及び3に示すとおり、紫外線処理、次亜塩素酸ナトリウム処理、どちらの処理においても毛髪の酸化タンパクの亢進が観察された。

## 【実施例3】

## 【0027】

フルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる毛髪酸化タンパク質の検出

一人の被験者（毛髪化学的処理経験なし）の毛髪の先端側を5センチの長さで4本採取し、洗浄剤（処方1）に室温で10分間浸して洗浄し、その後1時間水に浸してすすぎを行った。1本目に対しては、ブリーチ処理、2本目に対してはパーマ処理（臭素酸ナトリウム系）、3本目に対してはパーマ処理（過酸化水素系）、最後の4本目に対しては何の処理も行わなかった。ブリーチ処理は、以下に示す処方2のA剤、B剤、C剤を4:6:1の割合で混合し、毛髪をその中に室温で30分浸した。この作業を4回繰り返した。パーマ処理（臭素酸ナトリウム系）は、以下に示す処方3の1液に30℃で10分間浸して、30秒水洗いし、2液（臭素酸ナトリウム系）に30℃で10分間浸した。パーマ処理（過酸化水素系）は、処方3の1液に30℃で10分間浸して、30秒水洗いし、3液（過酸化水素系）に30℃で5分間浸した。ブリーチ処理、パーマ処理を行った毛髪は、最後に、洗浄剤（処方1）に室温で10分間浸して洗浄し、その後1時間水に浸してすすぎを行った。それらを乾燥させた後に、アロンアルファでスライドガラスに固定した。それを20μMのフルオレセイン-5-チオセミカルバジドの100mMのMES-Na緩衝液(pH5.5)に室温で1時間反応させた。反応終了後はPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察し、画像を1サンプルにつき8枚ずつ取り込んだ。数値化に際しては、画像から毛髪と背景を分離し、毛髪の平均輝度を求めた。

## 【0028】

処方2（ブリーチダメージ用のブリーチ剤処方）

A剤	原料名	配合量（質量%）
	アンモニア水(28%)	3.60
	イオン交換水	96.40
	合計	100.00
B剤	原料名	配合量（質量%）
	過酸化水素(30%)	20.00
	リン酸（一級）	0.20
	リン酸水素二ナトリウム（無水）	0.20
	スズ酸ナトリウム	0.02
	メチルパラベン	0.05
	イオン交換水	79.53
	合計	100.00
C剤	原料名	配合量（質量%）

過硫酸カリウム	74.22
メタケイ酸ナトリウム	17.62
硫酸アンモニウム	1.91
ピロリン酸ナトリウム	6.25
合計	100.00

## 【0029】

## 処方3 (パーマダメージ用のパーマ剤処方)

1 剤	原料名	配合量 (質量%)
	チオグリコール酸アンモニウム液 (50%)	12.90
	モノエタノールアミン	0.90
	炭酸アンモニウム (一級)	2.80
	尿素	1.00
	EDTA・3Na	0.10
	ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン (40%)	0.30
	イオン交換水	82.00
	合計	100.00

## 【0030】

## 2 剤 (臭素酸ナトリウム系)

	原料名	配合量 (質量%)
	臭素酸ナトリウム液 (20%)	40.00
	リン酸水素カリウム	0.30
	リン酸水素二ナトリウム (12水)	0.20
	イオン交換水	59.30
	合計	100.00

## 【0031】

## 3 剤 (過酸化水素系)

	原料名	配合量 (質量%)
	過酸化水素水 (31%)	6.45
	リン酸 (1%)	2.00
	リン酸水素二ナトリウム (12水)	0.03
	イオン交換水	91.52
	合計	100.00

## 【0032】

図4に各毛髪の平均輝度の結果を示す。パーマ処理、ブリーチ処理、ともに毛髪酸化タンパクの亢進が観察された。また、興味深いことに、過酸化水素系のパーマ処理の方が、臭素酸ナトリウム系のパーマ処理よりも酸化タンパクが多く観察された。これは、パーマ処理の方法が異なると毛髪が受ける酸化の度合いが異なることを反映しているものと考えられる。

## 【実施例4】

## 【0033】

## ダンシルヒドラジンによる毛髪酸化タンパク質の検出

一人の被験者 (毛髪化学的処理経験なし) の毛髪の先端側を5センチの長さで4本採取し、洗浄剤 (処方1) に室温で10分間浸して洗浄し、その後1時間水に浸してすすぎを行った。1本目に対しては、ブリーチ処理、2本目に対してはパーマ処理 (臭素酸ナトリウム系)、3本目に対してはパーマ処理 (過酸化水素系)、最後の4本目に対しては何の処理も行わなかった。ブリーチ処理は、処方2のA剤、B剤、C剤を4:6:1の割合で混合し、毛髪をその中に室温で30分浸した。この作業を4回繰り返した。パーマ処理 (臭素酸ナトリウム系) は、処方3の1液に30℃で10分間浸して、30秒水洗いし、2液 (臭素酸ナトリウム系) に30℃で10分間浸した。パーマ処理 (過酸化水素系) は、処方3の1液に30℃で10分間浸して、30秒水洗いし、3液 (過酸化水素系) に30℃で5分間浸した。ブリーチ処理、パーマ処理を

行った毛髪は、最後に、洗浄剤（処方1）に室温で10分間浸して洗浄し、その後1時間水に浸してすすぎを行った。それらを乾燥させた後に、アロンアルファでスライドガラスに固定した。それを50 $\mu$ Mのダンシルヒドラジンの100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）に室温で1時間反応させた。反応終了後はPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察し、画像を1サンプルにつき4枚ずつ取り込んだ。数値化に際しては、画像から毛髪と背景を分離し、毛髪の平均輝度を求めた。

#### 【0034】

図5に各毛髪の平均輝度の結果を示す。パーマ処理、ブリーチ処理、ともに毛髪酸化タンパクの亢進が観察された。また、興味深いことに、過酸化水素系のパーマ処理の方が、臭素酸ナトリウム系のパーマ処理よりも酸化タンパクが多く観察された。これは、パーマ処理の方法が異なると毛髪が受ける酸化の度合いが異なることを反映しているものと考えられる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0035】

【図1】フルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる毛髪酸化タンパク質の検出結果。

【図2】紫外線処理、次亜塩素酸ナトリウム処理による毛髪酸化タンパク質の亢進を示す蛍光顕微鏡写真図。

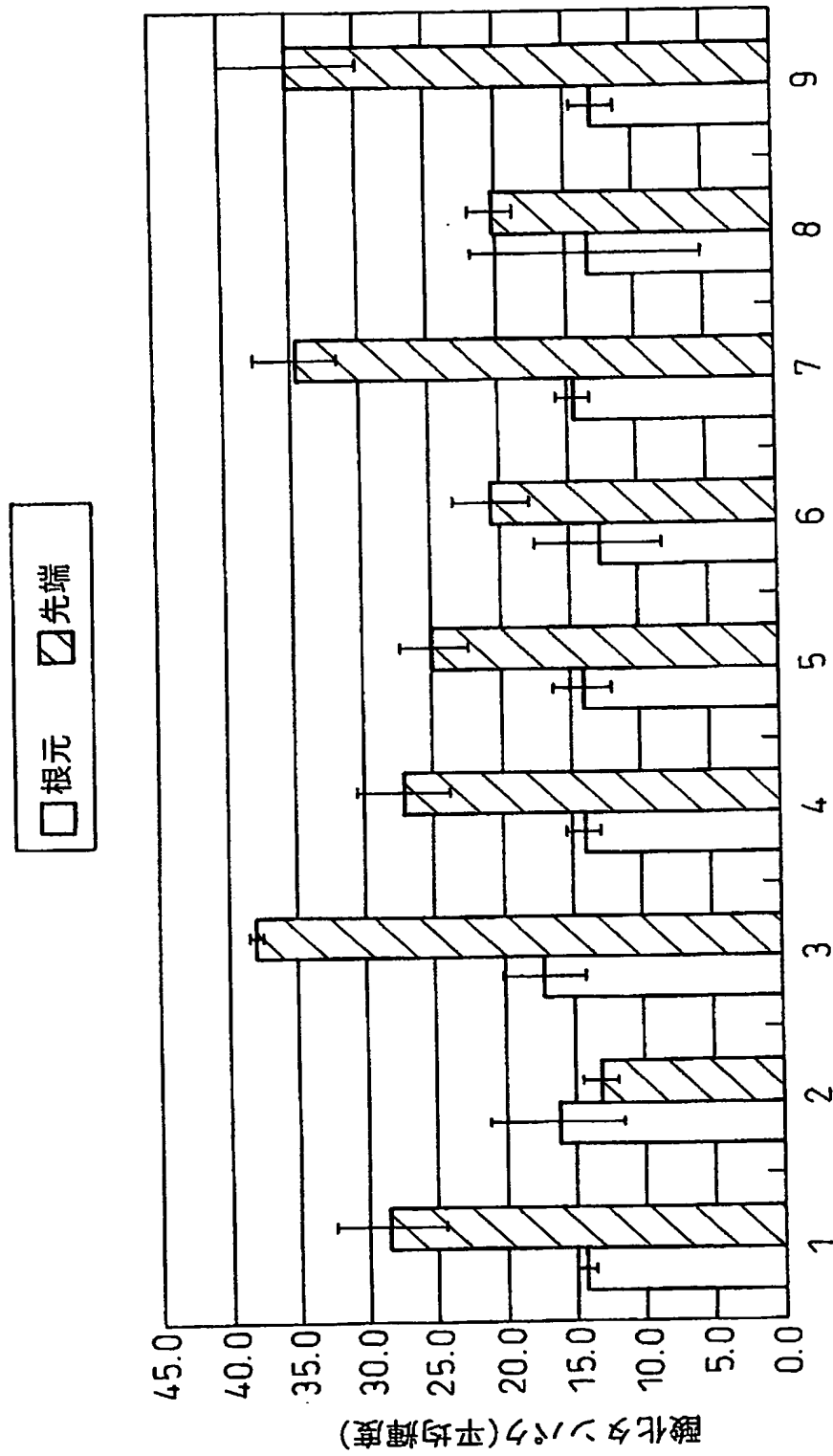
【図3】図2の結果を平均輝度に数値化した図。

【図4】平均輝度で示す、パーマ処理、ブリーチ処理による毛髪酸化タンパク質の亢進。

【図5】蛍光物質としてダンシルヒドラジンを用いた場合の、平均輝度で示す、パーマ処理、ブリーチ処理による毛髪酸化タンパク質の亢進。

【書類名】 図面  
【図1】

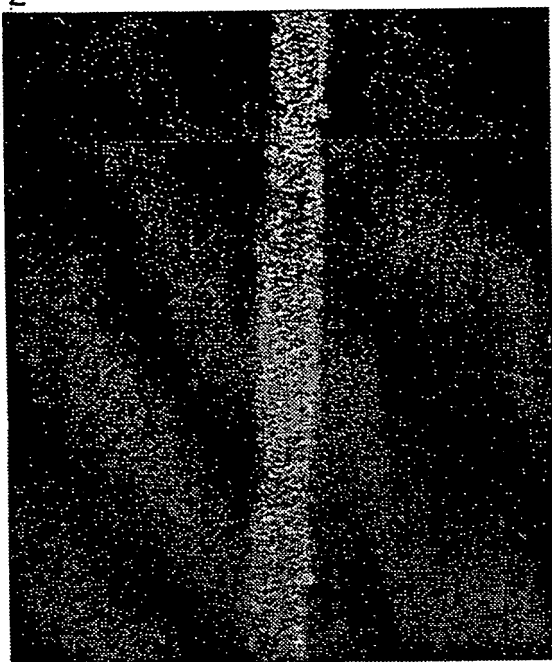
図1



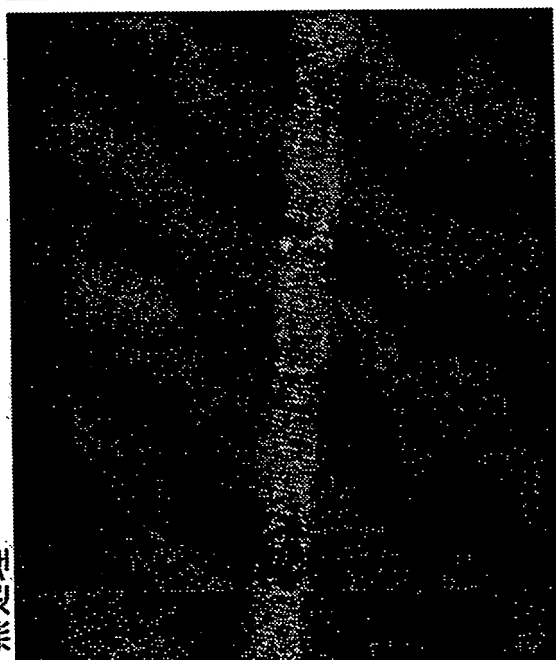
【図 2】

図 2

紫外線

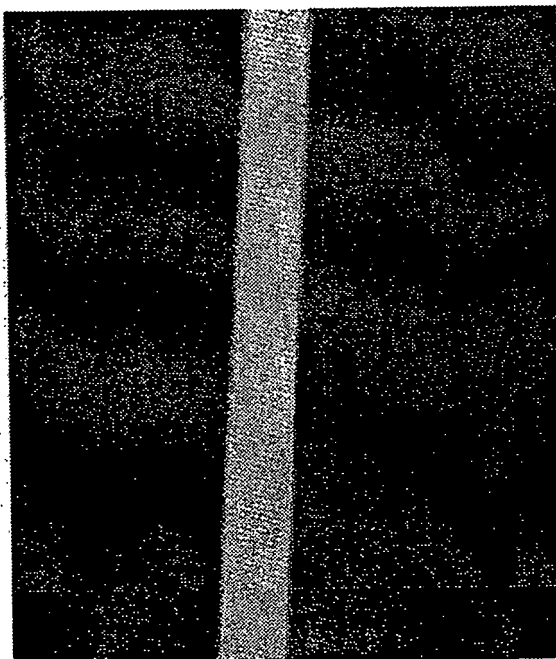


無処理



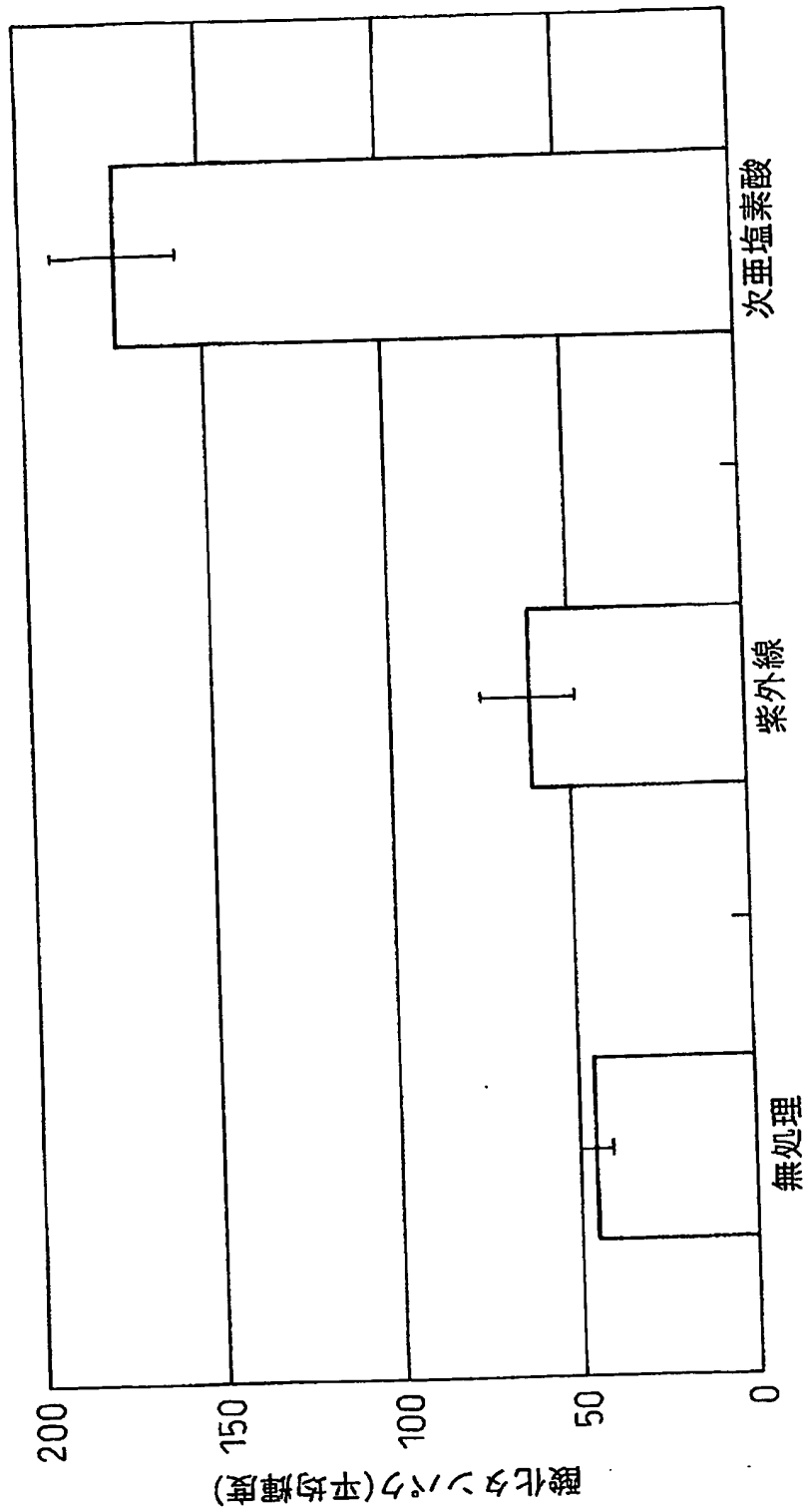
BEST AVAILABLE COPY

次亜塩素酸



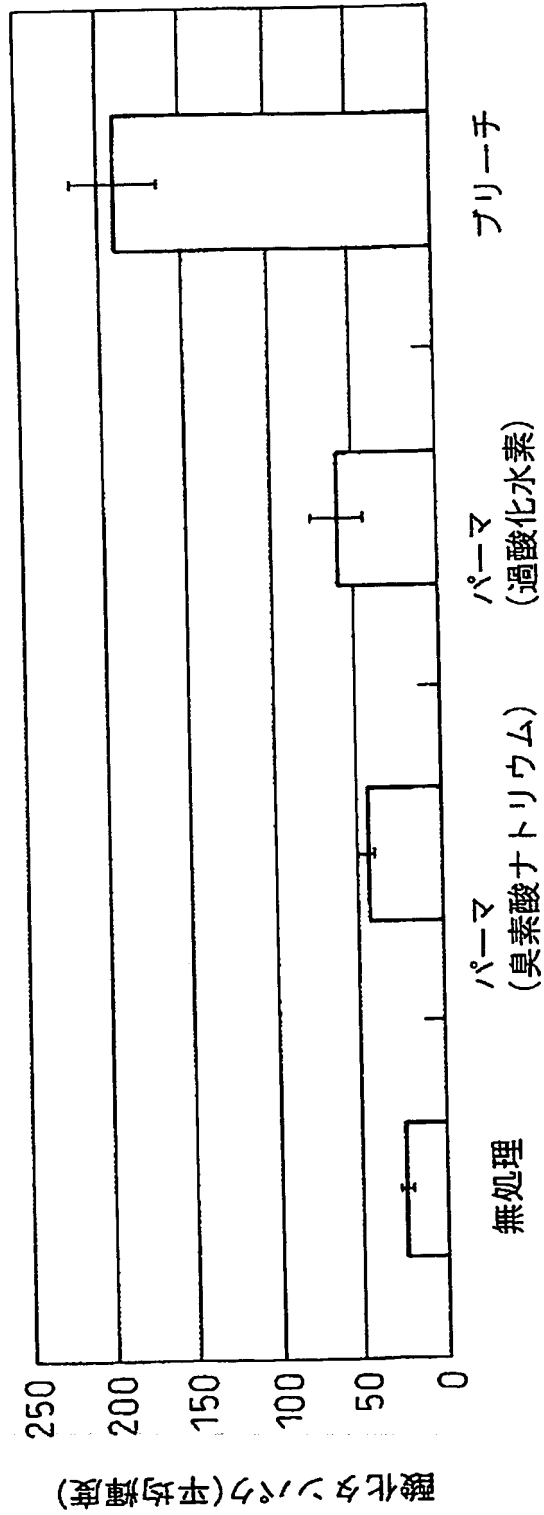
【図 3】

図 3



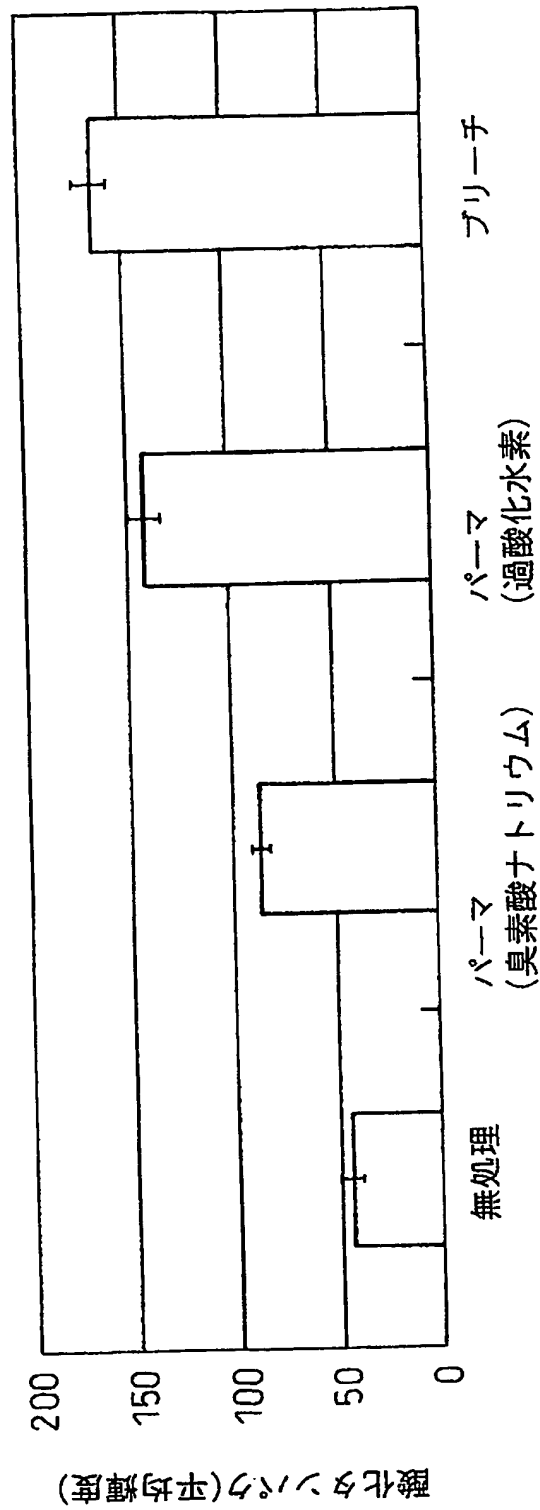
【図 4】

図 4



【図5】

図5





## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 本発明は、簡便で、しかも毛髪の実際のダメージをより正確に反映した、毛髪ダメージ度を評価する方法の提供を課題とする。

【解決手段】 本発明は、毛髪のダメージを評価する方法を提供する。この方法は、毛髪における酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで行うことを特徴とする。かかるダメージは毛髪のパーマ処理、ブリーチや酸化染毛剤処理、コーミング、ドライヤー等による熱処理、紫外線に対する暴露、プールでの次亜塩素酸に対する暴露のいずれか又はそれらの複数の組合せに起因し得る。

【選択図】 図 3

特願 2003-410415

出願人履歴情報

識別番号

[000001959]

1. 変更年月日

1990年 8月27日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区銀座7丁目5番5号

氏 名

株式会社資生堂

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018670

International filing date: 08 December 2004 (08.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-410415  
Filing date: 09 December 2003 (09.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse